

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：84408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850210

研究課題名（和文）胚体外環境に注目した新たなマウス胚発生アトラスの構築

研究課題名（英文）Establishment of novel morphological atlas of mouse embryonic development focusing on the extraembryonic environment

研究代表者

平松 竜司（Hiramatsu, Ryuji）

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター（研究所）・病因病態部門・客員研究員

研究者番号：70555284

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳類の胚発生は母体の子宮内で進行することから、胚発生における母体組織の役割を理解することが必要である。本研究は、これまで遺伝学・分子生物学的解析による知見を踏まえた、新たなマウス胚発生の形態学的アトラスの再構築を試み、マウス胚初期発生の解明につながる基礎データの獲得することを目的とした。そこで着床期を含む発生ステージにおけるマウス胚および子宮組織の形態学的解析ならびに免疫組織化学などの発現・局在解析により、胚と母体組織との形態的な相互関係を解析した。特に、着床が起こる胎齢4.5日における胚並びに子宮組織のダイナミックな形態変化により胚が子宮組織に取り込まれる様子を詳細に観察した。

研究成果の概要（英文）：In mammal, embryogenesis progresses in uterus of mother. Therefore, the understanding of the relationship between embryo and uterine tissue is required to revealing the detail process of early mouse embryonic development. I have investigated the relationship between mouse embryo and uterine tissue beyond implantation stage by performing histological and expression analysis. I have obtained the basic data to establish novel morphological atlas of early mouse embryo and maternal uterine tissue. Especially, I performed the detail observation of the dynamic morphological change of mouse embryo and uterine tissues at implantation stage (4.5 dpc). This observation revealed the process how the mouse embryo was incorporated in the uterine tissue.

研究分野：獣医解剖学

キーワード：胚発生 マウス 体軸形成

## 1. 研究開始当初の背景

受精から出生まで母体の卵管・子宮で進む哺乳類胚の発生過程の理解のため、着床前胚の体外培養技術、遺伝子改変マウス作成などの発生工学技術が発展した。また、近年の網羅的な遺伝子発現スクリーニングやライブイメージングなども加わり、哺乳類胚そのものの発生過程について、分子および細胞レベルで多くの知見が得られてきた。一方、本研究者の先行研究において、着床直後に進行する哺乳類個体発生における最初の極性である前後軸（頭尾軸）形成が、胚自律的に進むのではなく、母体組織によって制御されていること、また、この制御には「圧力」という力学的作用を介していることを形態学的解析並びにマイクロデバイスを用いた新規の胚培養系の確立により明らかにしていた（Hiramatsu et al. 2013）。このことは、哺乳類胚発生の理解に向けて、母体が胚発生に果たす役割への解析の必要性を意味していた。また、胚発生が三次元的に進行すること、また、胚が母体の子宮組織に取り囲まれているという幾何学的な環境要因が存在することを考えた場合、構造力学や材料特性など力学的な視点からの解析も、胚発生メカニズムの理解のため十分に考慮されるべき点であった。

## 2. 研究の目的

本研究は、胚及び母体組織の相互関係、内部の分子カスケード及び力学的要因も含めた外的影響など、哺乳類の胚発生を包括的に理解すべく、特に解明が遅れている発生初期（マウスで胎齢 8 日ごろまで）について、胚および母体組織の形態学的特徴を胚発生の時間軸に沿って解析することを目的とした。さらに、胚発生に重要であることが示されている遺伝子群や細胞外基質の発現マッピングも同時に行うことで、これまで分子レベルで明らかにされてきた知見と形態学的特徴

を改めて比較検討した。さらに、胚周囲の空隙（羊膜腔など）や胎盤などの各組織層の厚さなどの計測を行い、胚の体外培養に向けた子宮組織様の人工装置作成時に用いる数値データの蓄積を目的とした。これらの研究を通して、これまでに得られてきた分子生物学的な知見と合わせて、胚発生メカニズムについて、分子・細胞・個体レベルでの包括的な理解に向けた基礎データの提供を目指した。

## 3. 研究の方法

### （1）発生初期過程における胚および母体組織の形態的アトラスの作製

胎齢 8 日目までのマウス胚および母体子宮組織について、マウス胚の細かい発生ステージに沿って組織標本を作成し、母体組織を含めた胚発生過程の形態学的特徴を詳細に観察した。胚および母体組織の空間的相互関係を理解するため、マウス胚は子宮ごと採材し、標本作成を行った。標本は子宮に対して縦断軸並びに横断軸で連続切片を作成した。また、標本の収縮率の違いなど、固定液による切片像の変化の影響を検討するため、10%中性緩衝ホルマリン、パラホルムアルデヒド、ブアン固定液で条件設定を行った。その際、生体における母体組織や胚の大きさなどとの比較検討のため、液体窒素による固定後、凍結切片を作成した。これら切片標本を HE 染色にて形態観察を行った。

これらの試料を作成するにあたり、異なる母体間、および同腹の胚同士での発生段階の個体差を補正するため、着床前の時期においては胚の細胞数、着床後においてはこれまでに示されているマウスの発生ステージ分け（Theiler 1972; Downs and Davies 1993）を参考にしながら、詳細な胚の発生ステージ分けを行った。

作成した組織標本について、胚と周囲の子宮組織の形態学的特徴を詳細に観察すると

ともに、胚と周囲の卵管および子宮組織のサイズや径、細胞数、位置関係などの計測を行った。また、これらの解析で得られた連続切片画像を統合し、発生の時間軸に沿った母体組織並びに胚の三次元的形態変化の視覚化を試みた。

#### (2) 発生初期過程における細胞外基質アトラスの作製

遺伝子変異マウスや分子生物学的解析などにより、哺乳類胚発生において重要な機能を持つ様々な遺伝子が同定されてきた (Arnold and Robertson, 2009)。その中でも組織の骨格的・足場の役割を担うと同時に、その局所的な発現パターンにより、適切な場所に適切なタイミングで様々なシグナルを活性化させ、発生初期の形態形成の進行を制御していることが示され、胚及び母体組織の相互作用に関与することが想定される細胞外基質の発現・局在について解析した。

(1) 同様に、胎齢 8 日までの胚および子宮組織の組織切片を作成し、各種抗体および RNA probe を用いて免疫組織化学および in situ hybridization 法を行った。蛍光二次抗体もしくは DAB やアルカリポスタファーゼによるシグナルの検出を行った。胚の発生ステージ分けは (1) 同様に行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 発生初期過程における胚および母体組織の形態的アトラスの作製

胎齢 3~8 日目までのマウス胚および母体子宮組織について、マウス胚の細かい発生ステージに沿って組織標本を作成し、母体組織を含めた胚発生過程の形態学的特徴を詳細に観察した。妊娠子宮組織標本作成にあたり、固定方法を検討したところ、特に着床直後の胎齢 5~6 日胚において、ブアン固定では核や細胞膜などの細胞の構造は明瞭であるが、胚と子宮組織の間の羊膜腔が大きく拡大す

る傾向が認められた。一方、10%中性緩衝ホルマリンによる固定では、ブアン固定に比べて組織像が若干不明瞭になるが、胚と子宮組織間の間隙はほぼ認められなかった。液体窒素による凍結標本において、胚と子宮組織間の間隙は大きく認められなかったため、10%中性緩衝ホルマリン固定による標本が生体条件により近いと考えられ、こちらを本研究の標準法と決定した。

以上の条件により作成した標本の連続切片を HE 染色にて観察したところ、特に胎齢 4.5 日の着床前後で胚と子宮組織の構造に大きな変化が認められた。マウス胚の着床は壁側栄養外胚葉 (内部細胞塊と反対側) が子宮内膜上皮と接着するが、ここから胚が能動的に子宮内膜上皮内に侵襲するのではなく、胚を包み込むように、子宮内膜上皮が極栄養外胚葉 (内部細胞塊側) の方へ折りたたまれ、胎齢 5.0 日までには完全に折り込まれていく様子が認められた。折りたたまれた部分の子宮内膜上皮は、上皮構造が消失し、間葉系である脱落膜組織の一部へと構造が変化していた。一方、着床部位である壁側栄養外胚葉側が子宮組織を侵襲し、羊膜腔を広げることで胚の伸長する空間を形成する像が観察された (図 1)。以上の結果は、胚が子宮内膜上皮に接着するわずかな領域を契機として子宮内膜折りたたまれ、上皮構造が消失するという、大きな構造的変化が短期間で生じること、胚が子宮組織内に取り込まれる過程は、これまでの通説と異なり、胚能動的に侵襲するのではなく、子宮上皮に包まれることによることが強く示唆された。この結果は、本研究者の先行研究である、前後軸の形成に必要な羊膜腔のサイズ (約 90  $\mu\text{m}$ ) がどのように形成しているかのメカニズム解明につながると考えられる。また、この過程がマウス特有のものなのか、他の哺乳類でも認められるのかは、比較発生学的に興味深い点である。

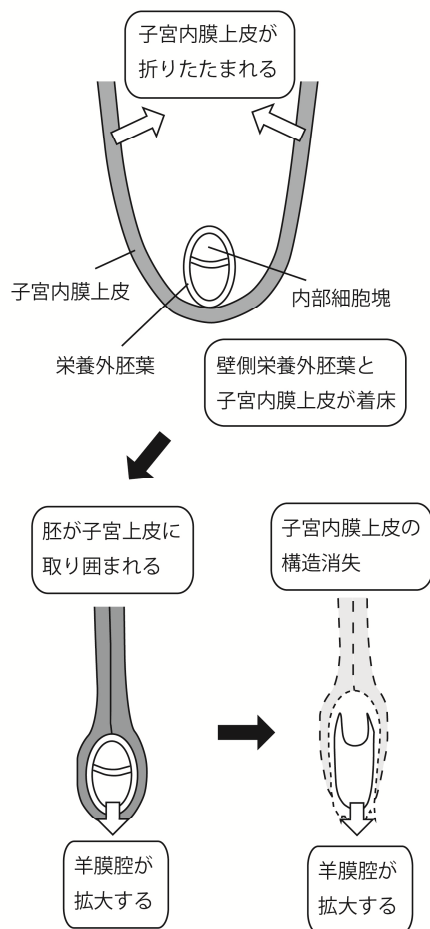


図1 着床直後の胚および子宮組織の形態変化の概略図

## (2) 発生初期過程における細胞外基質アトラスの作製

組織の骨格的・足場的役割を担うと同時に、その局所的な発現パターンにより、適切な場所に適切なタイミングで様々なシグナルを活性化させ、発生初期の形態形成の進行を制御していることが示され、胚及び母体組織の相互作用に関与することが想定される細胞外基質の発現・局在について免疫組織化学および *in situ hybridization* 法にて解析した。その結果、胚の栄養外胚葉、原始内胚葉などの胚体外組織での細胞外基質の局在が、同じ胎齢 4.5 日の着床前胚と着床直後胚で大きく異なっていた。特に原始内胚葉の細胞外基質の局在が、着床前では細胞全体的に認められ

るのに対し、着床後では大きく低下した。その後、原始内胚葉とエピプラストの境界領域に基底膜様に局在が認められた。また、細胞外基質の複数の遺伝子の mRNA の発現が、着床前胚では原始内胚葉全体に認められるのに対し、着床後胚では、胚体外外胚葉、臓側内胚葉、壁側内胚葉、外胎盤円錐、脱落膜が接する領域に局限する様子が認められた。また、細胞外基質たんぱく質の局在もこの領域で特に強く認められた。

以上のことから、細胞外基質遺伝子の発現並びにたんぱく質の局在は壁側栄養外胚葉が子宮上皮に接着するのをきっかけに劇的に変動する様子が明らかとなった。また、他の先行研究同様、細胞外基質遺伝子のノックアウトマウスにおいて、着床直後の胚発生が異常となることを確認した。

以上の解析から、着床をきっかけに胚と子宮組織ともに劇的に形態学的変化を生じること、また、特に細胞外基質の発現・局在を劇的に変化させ、胚発生に何らかの役割を担っていることが強く示唆された。今後は壁側栄養外胚葉と子宮上皮の着床がどのように胚全体の細胞外基質の発現・局在を短時間で変化させるかも含めて、胚発生における細胞外基質の役割を明らかにすることが必要と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Isao Matsuo and Ryuji Hiramatsu. Mechanical perspectives on the anterior-posterior axis polarization of mouse implanted embryos. *Mechanism of Development*, 査読有、144、2017年、62-70、doi: 10.1016/j.mod.2016.09.002.

〔学会発表〕(計4件)

**Ryuji Hiramatsu**, Isao Matsuo.  
Mechanical interaction among embryonic,  
extraembryonic and maternal tissues for  
the anterior-posterior axis formation in  
mouse embryo. EMBO Workshop:  
Embryonic-Extraembryonic Interfaces、2015  
年5月7日、Goettingen (Germany)

**Ryuji hiramatsu**, Chiharu Yoshida-Kimura,  
Isao Matsuo. Mechanical interaction  
between embryonic and maternal uterine  
tissue in the anterior-posterior axis  
formation of mouse embryo. 第37回日本  
分子生物学会年会、2014年11月25日、パシ  
フィコ横浜(神奈川県・横浜市)

**平松竜司** 胚発生過程における“力”をど  
のように捉えるか、2014年9月9日、第157  
回日本獣医学会学術集会、北海道大学(北海  
道・札幌市)

**平松竜司** 着床期の哺乳類胚発生におけ  
る胚-母体間の力学的相互作用、第54回先  
天異常学会学術集会、2014年7月26日、麻  
布大学(神奈川県・相模原市)口頭発表

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

[https://www.mch.pref.osaka.jp/research/  
embryology/index.html](https://www.mch.pref.osaka.jp/research/embryology/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平松 竜司 (HIRAMATSU, Ryuji)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府  
立母子保健総合医療センター(研究所)・病  
因病態部門・客員研究員

研究者番号: 70555284